

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-125669

(43) 公開日 平成6年(1994)5月10日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 H 1/00	Z	8502-2B		
5/00	Z	8502-2B		
G 0 1 N 27/447				
33/483	E	7055-2 J		
		7235-2 J		
			G 0 1 N 27/26	3 1 5 H

審査請求 未請求 請求項の数8(全11頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-277562

(22) 出願日 平成4年(1992)10月15日

(71) 出願人 591169618

農林水産省東北農業試験場長

岩手県盛岡市下厨川字赤平4番地

(72) 発明者 中 村 俊 樹

岩手県盛岡市下厨川字赤平4 C-46

(72) 発明者 山 守 誠

沖縄県石垣市登野城233

(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 Wx遺伝子発現の確認方法およびモチコムギの作出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 穀物、特にコムギにおける3種の遺伝子の発現の有無を個々に確認できる分析方法、3種のWxタンパク質が産性されないモチコムギの作出手段の提供。

【構成】 穀物Wx遺伝子の発現産物である複数のWxタンパク質を、二次元電気泳動法を用いて分離する。特に、コムギWx遺伝子の発現産物であるWxタンパク質Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を好ましくは等電点電気泳動とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動との組合わせによる二次元電気泳動法で分離する。Wx遺伝子Wx-A1およびWx-B1の発現を欠いた6倍体コムギ変異体とWx遺伝子Wx-D1の発現を欠いた6倍体コムギ変異体とを交配し、Wxタンパク質が産性されないモチコムギを作出する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】穀物Wx遺伝子の発現産物である複数のWxタンパク質を、二次元電気泳動法を用いて分離することを特徴とする、穀物におけるWx遺伝子発現の確認方法。

【請求項2】コムギWx遺伝子の発現産物であるWxタンパク質Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を、二次元電気泳動法を用いて分離することを特徴とする、請求項1記載のWx遺伝子発現の確認方法。

【請求項3】二次元電気泳動法が、等電点電気泳動とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動との組合わせである、請求項1または2記載のWx遺伝子発現の確認方法。

【請求項4】コムギWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を有しそのうちの2種の遺伝子の発現を欠いた6倍体コムギ変異体と、残りの1種の遺伝子の発現を欠いた6倍体コムギ変異体とを交配し、その後代において上記3種の遺伝子の発現を欠いた個体を得ることを特徴とする、モチコムギの作出方法。

【請求項5】交配が、Wx遺伝子Wx-A1およびWx-B1の発現を欠いたコムギ変異体とWx遺伝子Wx-D1の発現を欠いたコムギ変異体との組合わせによるものである、請求項4記載の作出方法。

【請求項6】請求項4または5に記載の作出方法によって得られるモチコムギ。

【請求項7】コムギWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を有しそのうちの2種の遺伝子Wx-A1およびWx-B1の発現を欠いた6倍体コムギ変異体と、二粒系コムギゲノム構成AABB個体とを交配し、その後代において上記2種の遺伝子の発現を欠いた4倍体個体を得ることを特徴とする、4倍体モチコムギの作出方法。

【請求項8】請求項7に記載の作出方法によって得られる、4倍体モチコムギ。

【発明の詳細な説明】

【0001】【発明の背景】

【産業上の利用分野】本発明は、穀物、特にコムギのWx遺伝子発現の確認方法ならびにこの確認方法を利用することができるモチコムギの作出方法およびこの作出方法によって得られるモチコムギに関するものである。

【0002】

【従来の技術】種子にモチ性が認められる作物としては、イネ、トウモロコシ、オオムギ、ジャガイモ、アワ、ソルガムなどが知られており、普通（ウルチ）系統のものにおいてはWxタンパク質が存在しているのに対して、モチ性系統ではこのWxタンパク質の存在が見られない。Wxタンパク質はWx遺伝子の発現産物であってアミロース合成に関与するデンプン合成酵素（Granule Bound Starch Synthase：GBSS）としての機能を有する。このWx遺伝子は、イネなどの2倍体植物では

2

1種の遺伝子として存在しており、低率（10⁻⁴）ではあるが突然変異によって欠落し（植物育種学、上巻、基礎編藤巻ら著、培風館、第80～82頁、1992年）、これによってWxタンパク質が産性されず普通系統のものがモチ性となる。これに対して、コムギでは3種のWx遺伝子を有する6倍体のもの（普通系統）および2種のWx遺伝子を有する4倍体のもの（マカロニ種など）が存在していることが知られている。6倍体である普通系コムギ（*Triticum aestivum* L.、ゲノム構成 AABBDD）では、3種のWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を染色体価7AS、4ALおよび7DS上に持つことがサザン法によって確認されている（Chaoら、Theor. Appl. Genet.、第78巻、495～504頁、1989年）が、Wx遺伝子の発現産物であるWxタンパク質は、SDS-PAGE法による電気泳動によって単一のバンドとしてしか検出されていない（山守ら、育種学雑誌、40巻（別冊1）第410～411頁、1990年）。また、6倍体コムギ（普通系統）および4倍体コムギ（マカロニ系統など）については現在のところモチ性のものは知られていない。

【0003】【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】コムギにおける3種のWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1の発現の有無を個々に確認できる分析方法が確立できれば、この分析方法を利用して特定のWx遺伝子の発現を欠いた変異体を見つけ出し、適当な変異体の組合わせを選択して交配することにより、コムギにおいてWxタンパク質が産性されない、すなわちWx遺伝子の発現を欠いたモチ性系統のものを作出することができる。本発明は穀物、特にコムギにおける3種の遺伝子の発現の有無を個々に確認できる分析方法および3種のWxタンパク質が産性されないモチコムギを作出する手段を提供することを目的とするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】従来のSDS-PAGE法でWxタンパク質が単一のバンドとしてしか検出されない原因は、コムギの胚乳中では1種のWx遺伝子しか発現していないためか、あるいは、複数の遺伝子が発現しているがその産物の分子量が同一もしくは近接することによりSDS-PAGE法では分離できず単一のタンパク質として検出されるため、の2点が考えられる。そこで本発明者等は、コムギのChinese Spring(CS)およびそのnullisomic-tetrasomic(NT)系統のWxタンパク質を二次元電気泳動法を用いて解析することによって、3種遺伝子由来の産物を検出することに成功した。この知見をもとに本発明を完成するに至った。すなわち、本発明によるWx遺伝子発現の確認方法は、穀物のWx遺伝子の発現産物である複数のWxタンパク質を二次元電気泳動法を用いて分離することを特徴とするものであり、この好ましい態様は、コムギWx遺伝子の発現産物であ

3

るWxタンパク質Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を二次元電気泳動法を用いて分離することを特徴とするものであり、このさらに好ましい態様は、二次元電気泳動法が等電点電気泳動とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動との組合わせのものである。また、本発明によるモチコムギの作出方法は、コムギWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を有しそのうちの2種の遺伝子の発現を欠いた6倍体コムギ変異体と残りの1種の遺伝子の発現を欠いた6倍体コムギ変異体とを交配し、その後代において上記3種の遺伝子の発現を欠いた個体を得ることを特徴とするものであり、この好ましい態様は、交配がWx遺伝子Wx-A1およびWx-B1の発現を欠いたコムギ変異体とWx遺伝子Wx-D1の発現を欠いたコムギ変異体との組合わせによるものである。本発明によるモチコムギの別の作出方法は、コムギWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を有しそのうちの2種の遺伝子A1およびB1の発現を欠いた6倍体コムギ変異体と、二粒系コムギゲノム構成AABB個体とを交配し、その後代において上記2種の遺伝子の発現を欠いた4倍体個体を得ることを特徴とするものである。本発明はまた、上記作出方法によって得られるモチコムギに関するものでもある。

【0005】（発明の具体的説明）普通系コムギ（*Triticum aestivum* L.（遺伝子型：AABBDD））における3種のWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1は3つの別々の染色体腕7AS、4ALおよび7DS上に存在しており（Chaoら、1989年、前記）、このWx遺伝子の発現によって産生されるWxタンパク質（Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1）は、デンプン粒に結合したタンパク質でアミロース合成に関与するデンプン合成酵素（顆粒性澱粉合成酵素（Granule Bound Starch Synthase：GBSS））である。

Wx遺伝子発現の確認方法

本発明によるWx遺伝子発現の確認方法は、穀物のWx遺伝子の発現産物である複数のWxタンパク質を二次元電気泳動法を用いて分離することを特徴とするものであり、特に、コムギにおけるWx遺伝子の発現産物であるWxタンパク質A1、B1およびD1を二次元電気泳動法を用いて分離することを特徴とするものであることは前記したところである。従来のSDS-PAGEによる電気泳動では、上記3種のWxタンパク質が単一のバンドとしてしか検出できなかったが、本発明における二次元電気泳動法により、これら3種のWxタンパク質を個々に分離確認すること、すなわち3種のWx遺伝子の発現の有無を確認することが可能となった。本発明による二次元電気泳動は、具体的にはたとえばタンパク質の有する固有の当電点の差を利用して分離を行う等電点電気泳動およびタンパク質の分子量の差を利用して分離を行うSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以後、SDS-PAGEともいう）との組合わせによるものであ

4

る。等電点電気泳動とSDS-PAGEの組合わせによる二次元電気泳動の好ましい方法は、基本的にはO'Farrellの二次元電気泳動法に従って実施することができる。二次元電気泳動の方法は、基本的には、分析しようとする試料、すなわちコムギ種子のデンプン（好ましくは精製されたもの）について一次元目の泳動として等電点電気泳動を行った後、泳動方向を90度変えて二次元目の電気泳動としてSDS-PAGE（ビスアクリルアミド濃度を下げたゲルを用いたSPS-PAGE（後述））を行って目的のWxタンパク質を二次元方向に分離し、分離試料について染色操作を施した後に染色パターンを解析することによってWxタンパク質の有無、すなわちWx遺伝子（Wx-A1、Wx-B1、Wx-D1）の発現の有無を確認することができる。

【0006】（1）デンプン試料の調製

Wx遺伝子発現の確認のための試料としてのコムギデンプンの調製は、デンプンを分離精製するための合目的な任意の方法を用いることができ、このような方法としてはたとえば、EchtおよびSchwartzの方法（Genetics, 99, 275~284, 1981年）があげられ、この方法に基づいて粗製デンプンまたは精製デンプンを得ることができる。EchtおよびSchwartzの方法に基づく調製法の概要は次の通りである。まず、各種系統の種子（通常は胚を取り除いた完熟種子）を粉砕した後、ふるい（通常60μm）にかけ、この粉に冷却した緩衝液または水、好ましくは緩衝液（たとえばドデシル硫酸ナトリウムを含む緩衝液（SDS緩衝液：後記（2）参照）を4℃程度に冷却したもの）を加え、ホモジナイズした後適当なフィルター（ミラクロスなど）で濾過する。濾液を遠心洗浄（通常15000rpmで5分間）し、上清（後に可溶性タンパク質サンプルとして利用できる）を除き、蒸留水およびアセトンなどで同様の洗浄をした後に乾燥（エバポレーターによる真空乾燥など）を行う。この方法において乾燥以外の操作は全て低温下（通常4℃下程度）で行い、乾燥させたデンプンは使用されるまでは-20℃程度の低温で保存されることが望ましい。この方法の詳細は後記実験例に記載されている。調製された粗デンプンまたは精製デンプンは、次に一次元目の電気泳動に供するための試料に調製する必要がある。この調製は次のような方法によって行うことができる。上記のように調製されたデンプン（好ましくは精製デンプン）に対してLysis緩衝液（たとえば、尿素（通常8M）、ノニデット（Nonidet）-P40（界面活性剤を主成分として含む、通常2%）、アンフォリン（Ampholine）、ポリアミノポリカルボン酸を主成分として含む、通常2%）、β-メルカプトエタノール（通常5%）、ポリビニルピロリドン（通常5%）からなる緩衝液）を一定の割合で（通常デンプン10mgに対して300μl程度）加え、通常、100℃で2分間熱処理を加えて氷中などの低温で10分間程度冷却するかあ

るいは加熱を加えずに室温で1時間程度放置する。これを遠心(通常15000rpmで10分間)することにより、上清を電気泳動用の試料とすることができる。このようにして得られたデンプン溶出液を好ましくは100~300 μ l、より好ましくは200 μ l程度の量で一次元目の電気泳動、好ましくは等電点電気泳動に供試する。試料としての上清の量は通常の泳動の場合には10~20 μ lであり、このような量では最終的にWxタンパク質のスポットの確認が極めて困難であるが、上記のような量を使用することによって3種のWxタンパク質のスポットの確認が可能となる。なお、デンプン試料の濃度の大小に対応してこの使用量を変化させることができる。

【0007】(2) 等電点電気泳動

等電点電気泳動の具体的な操作方法是、基本的には前記O'Farrellの方法に従うことができるが、一般的な操作の概要は以下に示す通りである。まず、泳動用の支持溶液を作成する。支持溶液は、アクリルアミドを基本とするゲル(通常30%)溶液が好ましい。ゲル用溶液としては、通常この目的に用いられる任意のものが適用できるが、下記のような組成配合のものが一般的である。

尿素

30%アクリルアミド溶液(高純度品)

純水

10%NP-40

アンフォライン(pH3.5~10)

アンフォライン(pH5~8)

10%過硫酸アンモニウム

TEMED(テトラメチルエチレンジアミン)

上記の配合およびアンフォラインの組合せは、必要に応じて支持溶液としての機能を維持する範囲で任意に変化させることができる。次に、ゲル溶液を垂直に立てた等電点電気泳動用ガラス管に注入してゲル化させ、上側に前記Lysis緩衝液を重ねる。一方の陽極電極槽に酸性溶液(たとえば0.01Nリン酸溶液)を入れ、他方の陰極電極槽に塩基性溶液(たとえば0.02N NaOH)を入れて適当な条件で予備通電した後、デンプン試料を前記したように100~300 μ l、より好ましくは200 μ l程度ゲルトに重ねる。適当な泳動条件、通常、400V(定電圧)で16~18時間、必要に応じて更に800V(定電圧)で1時間程度泳動を行う。泳動条件は全体で5000~10000V・時間となるようにすることが望ましい。泳動終了後、ガラス管よりゲルを抜き出して適当な緩衝液(たとえばSDS緩衝液:0.1MトリスHCl(pH6.8)、2.3% SDS、5% β -メルカプトエタノール、10%グリセロール)で平衡化し、これを二次元目のSDS-PAGEのために使用する。

【0008】(3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEの具体的な操作方法については一般的な文献もしくは書物、(たとえばLaemmli:Nature, 227:680~685, 1970年)の方法を参照することができるが、好ましくはLaemmliの変法である低ビス濃度SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法(Hirano, J. Protein chem. 8:115~130, 1989およびKagawa and Hirano, Japan J. Breed. 38:327~332, 1988)を参照することができる。操作の概要は以下に示す通りである。まず、泳動用の分離ゲル用溶液を作成する。分離ゲル用溶液としては、下記のような組成配合のものが一般的である。

分離ゲル用緩衝液

分離ゲル用アクリルアミド溶液

純水

10%過硫酸アンモニウム

TEMED

分離ゲル用アクリルアミド溶液は通常次のような配合である。

分離ゲル用アクリルアミドストック液(アクリルアミド:ビス=30:0.135:

アクリルアミド(電気泳動用)

メチレンビスアクリルアミド(電気泳動用)

純水

分離ゲル用緩衝液は通常下記のような配合である。

分離ゲル用緩衝液(1Mトリス・HCl pH8.8/0.27% SDS):

トリス(電気泳動用)

SDS

純水

このように調製した分離ゲル溶液を泳動用のガラス板の間に注入してゲル化させる。濃縮ゲル用溶液を調製する。濃縮ゲル用溶液としては、下記のような組成配合のものが一般的である。

濃縮ゲル用緩衝液 3ml

濃縮ゲル用アクリルアミド溶液 1ml

純水 2ml

10%過硫酸アンモニウム 30 μ l

TEMED 20 μ l

濃縮ゲル用アクリルアミド溶液は通常次のような配合である。

濃縮ゲル用アクリルアミドストック液(アクリルアミド:ビス=30:0.8)

アクリルアミド(電気泳動用)

メチレンビスアクリルアミド(電気泳動用)

純水

濃縮ゲル用緩衝液としては、通常次のような配合が用いられる。

分離ゲル用緩衝液(0.25Mトリス・HCl pH6.8/0.2% SDS):

トリス(電気泳動用)

SDS

純水

このように調製した濃縮ゲル用溶液を分離ゲル上に注入してゲル化させる。電気泳動用アガロース（高純度のものが望ましい）用溶液（通常SDS緩衝液中アガロース1%（W/V））を濃縮ゲルに加えてゲル化させる。分離ゲル用溶液および濃縮ゲル用溶液の配合割合は、必要に応じてそれらの機能を維持する範囲で任意に変化させることができる。泳動用緩衝液槽に泳動用緩衝液を加えて適当な泳動条件、通常ゲル1枚当たり20mA（定電流）で泳動を行う。この時、コントロールとしてプロムフェノールブルー（BPB）などの色素を標準物質として泳動用緩衝液に加えておくことが望ましい。泳動用緩衝液は通常次のような配合である。

電気泳動用緩衝液：

トリス

グリシン

SDS

純水

標準物質を目安として適当な時点で泳動を停止し、分離ゲルを取り出した後に染色操作を行う。染色方法は、タンパク質を染色するためのものであれば一般的に用いられる任意の方法が可能であり、たとえば、クマシーブリリアントブルーによる染色などがある。上記したような二次元電気泳動により得られる結果（Chinese-Spring(CS)およびそのnullisomic-tetrasomic(NT)系統を用いたWxタンパク質の二次元電気泳動法による解析）は図1～2に示される通りであり、3種のWxタンパク質の存在の有無を個々に確認できることがわかる。すなわち、図1に示される通り、コムギChinese-Spring(CS)系統のタンパクは高分子量と低分子量の二つのサブユニットグループ（SG）に分かれること、高分子量のSGはN7AT7B、N7AT7Dでは検出されないこと、N4AT4B、N4AT4Dでは低分子量SGの酸性側のサブユニットが薄くなるか欠失していること、一方N7DT7A、N7DT7Bでは逆に塩基性側のサブユニットが欠失していること、が認められる。これらの結果より、明らかに高分子量のSGは7A染色体上のWx-A1遺伝子にコードされていることが、また、低分子量のSGは4A染色体上のWx-B1遺伝子および7D染色体上のWx-D1遺伝子にコードされており各々の遺伝子由来のSGの等電点は若干異なるため両者のサブユニットが部分的に重なった形になっていることも明らかになった。これらの結果を単純なダイアグラムにすると図2のようになる。また、図3は、3種遺伝子のうちWx-A1だけが発現していない変異個体（wx^a）、Wx-A1およびWx-B1の両方が発現していない変異個体（wx^a b^a）、Wx-D1だけが発現していない変異個体（Wx^o）における泳動図およびそのダイアグラムを示すものである。

【0009】モチコムギの作出方法

前述のように、普通系コムギ（*Triticum aestivum* L.）には3種のWx遺伝子、すなわちWx-A1、Wx-B1およびWx-D1（遺伝子型AABBDD）が存在しており、このWx遺伝子の発現産物であるWxタンパク質、すなわちWx-A1、Wx-B1およびWx-D1タンパク質は、デンプン粒に結合したタンパク質であってアミロース合成に関与するデンプン合成酵素である。従って、コムギにおいてこのタンパク質が欠失するとアミロースが合成されず、アミロペクチンだけとなるデンプン、すなわちモチデンプンになる。本発明は、モチコムギの作出方法にも関するものであり、この作出方法は基本的に、3種のWx遺伝子のうちの特定のWx遺伝子の発現を欠いた適当な組み合わせによる6倍体コムギ変異体同士の交配によりすべてのWx遺伝子の発現を欠いた6倍体個体を作成するもの、および特定のWx遺伝子の発現を欠いた6倍体個体と4倍体（二粒系）コムギゲノム構成AABB個体との適当な組み合わせによる交配により4倍体個体を作成するものである。これらの作出方法は、上述してきたような本発明によるWx遺伝子の確認方法の確立により、コムギにおける3種のWx遺伝子の発現の有無、すなわちWx遺伝子発現産物もしくはWx-A1、Wx-B1およびWx-D1タンパク質の存在の有無が個々に確認できるようになり、これによって本発明作出方法が可能になった。なお、本発明において「個体」とは、植物体および種子の両者を包含するものである。

【0010】（1）6倍体モチコムギの作出方法

本発明による6倍体モチコムギの作出方法は、コムギWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を有しそのうちの2種の遺伝子の発現を欠いた6倍体コムギ変異体と、残りの1種の遺伝子の発現を欠いた6倍体コムギ変異体とを交配し、その後代において上記3種の遺伝子の発現を欠いた個体を得ることを特徴とするものであり、必要となる上記変異体は、代表的には前記したような本発明によるWx遺伝子発現の確認方法を用いることによって所望の組み合わせのものを選択することができる。Wx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1のうちの2種の発現を欠いた6倍体コムギ変異体としては、Wx-A1とWx-B1、Wx-B1とWx-D1、およびWx-A1とWx-D1の組み合わせのものがあろうが、その代表例としては、Wx-A1タンパク質とWx-B1タンパク質の発現を同時に欠く変異体である。従って、6倍体モチコムギの作出方法の代表例は、Wx-A1タンパク質とWx-B1タンパク質の発現を共に欠いているWx-D1タンパク質の発現能力を維持している6倍体変異体と、Wx-A1タンパク質とWx-B1タンパク質の発現能力を共に有しているがWx-D1タンパク質の発現のみを欠いた6倍体変異体とを交配することによって全て（3種）のWx遺伝子の

発現を欠いた、すなわち3種のWxタンパク質の産生のないモチ性の個体を得るものである。この作出方法の具体的な内容を以下に説明する。Wx-A1タンパク質とWx-B1タンパク質の発現を共に欠いているがWx-D1タンパク質の発現能力を維持している6倍体コムギ（たとえば、パンコムギ関東107号）の遺伝子型をaabbDDと表記すれば、Wx-D1タンパク質の発現のみを欠いたコムギはAABBddと表記することができる。この両者を通常の方法によって交配することにより、一代雑種個体（F₁種子）を得ることができる。コムギの交配によるF₁種子の生産方法に関しては一般的な文献あるいは書物（たとえば植物遺伝学実験法、常盤恒一郎編集、p278～279、1982年）を参照することができるが、基本的な操作手順は次のようにする。片方のコムギが開花する2～3日前におしべをピンセットなどで取り去り（除雄）、パーチメント袋（硫酸紙）をかぶせる。2～3日後に袋をはずし、このコムギのめしべに他方のコムギの花粉を毛筆などでふりかける。他からの花粉の飛来を避けるため再び袋をかぶせる。交配が成功していれば30～40日後に種子が得られる。このようにして得られるF₁種子は3種の遺伝子に関してヘテロ（すなわち3性雑種）になるので、その遺伝子型はAaBbDdと表記される。次に、このF₁個体を自家受粉させて雑種第2代（F₂個体）を得る。コムギの自家受粉による種子生産方法については一般的な文献あるいは書物（たとえば上記植物遺伝学実験法、第277頁を参照することができるが、基本的な操作手順は、他からの花粉の飛来を避けるため開花1～3日前にパーチメント（硫酸紙）袋をかぶせるようにする。上記のようにして得られるF₂種子の一粒づつについて、電気泳動法によりWxタンパク質の存在の有無を分析する。電気泳動は、本発明によるWx遺伝子の確認方法における二次元電気泳動法を用いればよい。電気泳動分析の結果Wxタンパク質が検出されないモチ性のコムギ個体を選抜する。Wx遺伝子は互いに異なる3つの染色体上にあるので（Chaoら、Theor. Appl. Genet. 第78巻、495～504頁、1989年、前記）、このF₂世代においてはメンデルの法則（分離および独立の法則）に従って1/64（=1/4×1/4×1/4）の割合で遺伝子型aabbddのコムギ個体が得られる。すなわち3性雑種のF₂世代においてはメンデルの法則により遺伝子型A-B-D、A-B-dd、A-bbD-、aabbD-、A-bbdd、aabbD-、aabbddの個体がそれぞれ27:9:9:9:3:3:3:1（計64）の比で分離し（「育種学」、松尾孝嶺著、養賢堂、98頁、1978年）（ここで、A-はAAまたはAa、B-はBBまたはBb、D-はDDまたはDdを表す）、従って、F₂種子において1/64の割合で遺伝子型aabbddのコムギ個体が得られる。このコムギの表現型は3種の

Wxタンパク質（A1、B1、D1）発現が欠失したものであり、従って、このコムギ個体はWxタンパク質の発現を欠いたモチコムギとなる。最終的に得られるWxタンパク質の発現を欠いたコムギ種子（粉）についてアミロース含量を測定し、そのモチ性（アミロース0%）を確認する。アミロース量の測定方法に関しては、一般的な文献あるいは書物（たとえば黒田ら、育種学雑誌、第39巻（別冊2）142～143頁、1989年）を参照することができ、通常ヨード・ヨードカリ呈色反応が用いられる。交配の組合わせとして、Wx-B1タンパク質とWx-D1タンパク質の発現を欠いた6倍体変異体とWx-A1タンパク質のみの発現を欠いた6倍体変異体との組合わせ、およびWx-A1タンパク質とWx-D1タンパク質の発現を欠いた6倍体変異体とWx-B1タンパク質のみの発現を欠いた6倍体変異体との組合わせの場合においても、上述した方法と同様にしてそれぞれF₂世代において1/64の割合でWxタンパク質発現を欠いたモチコムギを得ることができる。また交配の一方の変異体である2種の遺伝子の発現を欠いた6倍体変異体としては、上記の他に1種づつ遺伝子の発現を欠いたものの交配によって得られたものを使用することも可能である。このようにして得られるモチ性F₂個体およびその後代の個体（F₃以後の種子または植物体）はすべてモチコムギとなり、本発明はこれらもすべて包含するものである。

【0011】（2）4倍体モチコムギの作出方法

本発明による4倍体モチコムギの作出方法は、コムギWx遺伝子Wx-A1、Wx-B1およびWx-D1を有しそのうちの2種の遺伝子A1およびB1の発現を欠いた6倍体コムギ変異体と、二粒系コムギゲノム構成AABB個体とを交配し、その後代において上記2種の遺伝子の発現を欠いた4倍体個体を得ることを特徴とするものである。必要となる上記6倍体コムギ変異体は、本発明によるWx遺伝子発現の確認方法を用いることによって所望のものを選択することができ、また4倍体コムギは従来知られているものの中から所望のものを選択することができる。この4倍体モチコムギの作出方法は言い換えれば、Wx-A1タンパク質とWx-B1タンパク質の発現を共に欠いているがWx-D1タンパク質の発現能力を維持している6倍体変異体と、二粒系コムギゲノム構成AABB個体とを交配することによって全ての遺伝子（2種）の発現を欠いた、すなわちWxタンパク質の産生のないモチ性のコムギ個体を得るものである。この作出方法の具体的な内容を以下に説明する。6倍体コムギと4倍体コムギの交雑後代から4倍体コムギが出現することは古くから知られており（「小麦の合成」、木原均著、274～293頁、講談社、1973年）、いくつかの4倍体コムギが得られている。Wx-A1タンパク質とWx-B1タンパク質の発現を同時に欠いた6倍体コムギ（染色体数2n=42）（たとえばパンコ

ムギ関東107号)の遺伝子型を $aabbDD$ と表記すれば、 $Wx-A1$ タンパク質と $Wx-B1$ タンパク質の発現能力を持つ4倍体コムギ(染色体数 $2n=28$)

(マカロニ種など)は $Wx-D1$ 遺伝子を得たないので $AABB$ と表記することができる。この両者を通常の方法によって交配することにより F_1 個体を得ることができる。コムギの6倍体コムギと4倍体の交配による F_1 種子の生産方法に関しては一般的な文献あるいは書物

(たとえば前記植物遺伝学実験法、278~279頁)を参照することができるが、基本的な操作手順は(1)の6倍体もチコムギの作出方法において前記した方法のようにする。このようにして得られる F_1 種子の遺伝子型は $AaBbD$ となる。次に、この F_1 個体を自家受粉させて F_2 個体を得る。コムギの自家受粉による種子生産方法については(1)6倍体コムギの作出方法の場合と同様である。上記のようにして得られる F_2 種子の一粒づつについて、電気泳動法により Wx タンパク質の存在の有無を分析する。電気泳動は、本発明による Wx 遺伝子の確認方法における二次元電気泳動法を用いればよい。また、アミロースの測定(ヨウ素・ヨードカリ呈色反応など)によればより簡単に確認することができる。実際には、種子を分析用と次世代の植物体栽培のために胚を含む部分を分けておく必要がある。電気泳動分析あるいはアミロース測定の結果 Wx タンパク質が検出されないモチ性のコムギ個体を選択する。上記の F_1 個体の遺伝子型において、 $A \cdot a$ および $B \cdot b$ に関してのみ注目すれば、これらは対をなしているので、メンデルの法則により後代の F_2 において遺伝子型 $aabb$ の個体が $1/64 (= 1/4 \times 1/4)$ の割合で得られ、 D に関しては対をなしていないので、この遺伝子($Wx-D1$)が座乗している染色体(7D)は F_2 世代以降に脱落するものがある(前記、「小麦の合成」274~293頁、1973年、14頁6行)。従って $aabb$ の個体の中に $Wx-D1$ も欠いた個体が出現する。 $Wx-D1$ の欠失はこれが座乗する染色体(7D)の欠落の結果であるので、6倍体コムギでは $Wx-D1$ はなくならず、染色体数の減少した4倍体コムギにおいてすべての Wx タンパク質(この場合は $Wx-A1$ タンパク質と $Wx-B1$ タンパク質の2種)をなくすることが可能となる。このように染色体を欠落したものは正常な6倍体コムギに復帰することはなく、減少の方向に進み4倍体となる(前記「小麦の合成」274~293頁、1973年、14頁6行)。すなわち、染色体数の減少した4倍体コムギでのみ Wx タンパクの削除された個体を得られる。このコムギ個体は Wx タンパク質の発現を欠いたモチコムギとなる。最終的に得られる Wx タンパク質の発現を欠いたコムギ種子について、染色体数($2n=28$)およびアミロース含量を測定し(通常ヨウ素・ヨウ素カリ呈色反応)、そのモチ性(アミロース0%)を確認する。アミロース量の測定方法に関しては、一般的な

文献あるいは書物(たとえば黒田ら、育種学雑誌、前出)を参照することができる。また染色体数の測定に関してはたとえば前記植物遺伝学実験法、284~286頁を参照することができ、その方法は基本的には、発芽した種子の根を前処理(氷水(0℃)中24時間程度浸漬)し、固定液(たとえば、酢酸:エチルアルコール=1:3の比からなる液)で固定した後、それを酢酸カーミン(カーミンを1%になるように45%酢酸に溶かしたもの)に浸して、染色体を染め、顕微鏡でその数を数えるものである。また交配の一方の変異体である2種の遺伝子の発現を欠いた6倍変異体としては、上記の他に1種づつ遺伝子の発現を欠いたものの交配によって得られたものを使用することも可能である。このようにして得られるモチ性 F_2 個体およびその後代の個体(F_3 以後の種子または植物体)はすべてモチコムギとなり、本発明はこれらもすべて包含するものである。

【0012】

【実施例】以下は、実施例によって本発明を更に詳細に説明するものであるが、本発明はこれによって限定されるものではない。

例1:コムギ Wx 遺伝子発現(Wx タンパク質)の確認

(1) デンプンの精製

デンプン精製は、EchtとSchwartzの方法にもとづいて行われた。まず、各品種系統の完熟種子から胚を取り除き、粉碎した後に $60 \mu m$ のふるいを通して粉を準備した。粉 $200 mg$ 当り $1 ml$ の割合で冷却したドデシル硫酸ナトリウムを含むバッファー(SDS-buffer: $0.1 M$ Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% SDS, 5% β -mercapto ethanol, 10% glycerol)を加え、2分間ホモジェナイザーをかけた後ミラクロスを用いて濾過した。次に濾液を $15000 rpm$ で5分間遠心して、上清を捨て、再びSDS-bubherを加えて懸濁し、再び遠心をかけた。この操作を3回繰り返した後、蒸留水を加えて同様な操作を2回、さらに蒸留水をアセトンに変えて3回行い、最後にロタリーエバポレーターにより真空乾燥を行った。乾燥以外の操作は全て4℃下で行い、乾燥させたデンプンは、 $-20^\circ C$ で使用まで保存された。上述の様に、精製されたデンプン $10 mg$ に $300 \mu l$ のLysis-buffer(8M Urea, 2% Nonidet-P40, 2% Ampholine pH 3.5~10, 5% β -mercaptoethanol, 5% polyvinylpyrrolidone)を加え、 $100^\circ C$ で2分間熱処理を加えて氷中で10分間冷却する(あるいは加熱を加えず、室温で1時間放置する)。 $15000 rpm$ で10分間遠心し、上清 $200 \mu l$ を1次元目であるIEF(等電点電気泳動)に供試する。

(2) 二次元電気泳動

二次元電気泳動を次の操作方法に従って実施した。一次元目の等電点電気泳動用ガラス管を用意し、底部をパラフィルムでシールする。紙タオルを底に敷いたガラス管立てに、垂直に立てる。 $100 ml$ ビーカー中に試薬を以下の順に混合し、一次元目のゲル溶液を調製する。

13

14

(100数本分)

尿素	4.8g
30%アクリルアミド溶液(高純度品)	1.16ml
純水	2.84ml
10%NP-40	2.0ml
アイフォライン(pH3.5~10)	0.25ml
アイフォライン(pH5~8)	0.25ml
10%過硫酸アンモニウム	15 μ l
TEMED	10 μ l

10mlの注射器を用いて、ガラス管の上部より1cmの高さまで、ゲル溶液を注入する。このとき、ガラス管中に気泡が入らないように注意し、気泡が入ってしまったら、ガラス管を軽く振って気泡を除く。ゲルの上部に純水を重層する。2~3時間放置して、ゲル化する。ゲルに重層した水を注射器で除き、10 μ lのLysis 緩衝液をゲルに重層する。陽極側電極層(下側)に0.01Nリン酸を入れ、ガラス管のLysis 緩衝液の上に0.02N NaOHを静かに重層し、陰極側電極層(上側)も0.02N NaOHで満たす。200V(定電圧)で15分間、300V(定電圧)で15分間、400V(定電圧)で30分間、予備通電する。予備通電終了後、一旦、陰極側電極層(上側)の溶液を除き、ガラス管中の溶液を注射器で抜き取る。エッペンドルフ・チューブにサンプルを準備する。調製した試料の200 μ lに重層する。残存するNaOHと試料が反応して沈澱が生じることもあるので注意する。その上に、3倍に希釈したLysis 緩衝液を10 μ l重層し、更に、0.02N NaOHを重層する。400V(定電圧)で16~18時間、*

10*泳動する。800V(定電圧)で1時間、泳動する。(全体で5000~10000V・時間となるようにする。)

純水を満たした注射器で、ゲルとガラスの間に水を注入しながら、静かにゲルを抜き出す。このとき、陽極側に銅線等を入れると、後で酸性側/塩基性側の確認が容易にできる。小型サンプル管に泳動後のゲルを入れ、SDS サンプル緩衝液を5mlを加えて30分間、振とうしてゲルを平衡化する。液を交換して、更に、30分間振とうして平衡化する。

20 二次元目分離ゲル(15%)を下記の配合で調製する(1枚分)

分離ゲル用緩衝液	6.3ml
分離ゲル用アクリルアミド溶液	8.5ml
純水	2.0ml
10%過硫酸アンモニウム	120 μ l
TEMED	20 μ l

分離ゲル用アクリルアミド溶液および分離ゲル用緩衝液は次のように作成する。

分離ゲル用アクリルアミドストック液

(アクリルアミド:ビス=30:0.135)

アクリルアミド(電気泳動用)	30g
メチレンビスアクリルアミド(電気泳動用)	0.135g
純水に溶かして100mlとし、遮光して保存。	
分離ゲル用緩衝液(1Mトリス・HCl pH8.8/0.27% S	

DS)

トリス(電気泳動用)	12.11g
SDS	0.27g

約80mlの純水に溶かし、塩酸によりpHを8.8に調整する。最終容量を10mlとする。二次元目用のガラス板の間に、上から約3cmの高さまで注入する。約1mlの純水が静から重層して、30分間放置する。

二次元目濃縮ゲルを下記の配合で調製する(1枚分)

濃縮ゲル用緩衝液 3ml

濃縮ゲル用アクリルアミド溶液	1ml
純水	2ml
10%過硫酸アンモニウム	30 μ l
TEMED	20 μ l
濃縮ゲル用緩衝液および濃縮ゲル用アクリルアミド溶液は次のように作成する。	

濃縮ゲル用アクリルアミドストック液

(アクリルアミド:ビス=30:0.8)

アクリルアミド(電気泳動用)	30g
メチレンビスアクリルアミド(電気泳動用)	0.8g
純水に溶かして100mlとし、遮光して保存。	
分離ゲル用緩衝液(0.25Mトリス・HCl pH6.8/0.2	

% SDS)

15

トリス (電気泳動用)
SDS

約80mlの純水に溶かし、塩酸によりpHを6.8に調整する。最終容量を10mlとする。これを分離ゲルの上に注入する。高純度の電気泳動用アガロースをSDSサンプル緩衝液に1% (W/V) になるように加えて、湯浴中で加熱して溶解する。濃縮ゲルの上に、アガロース溶液を加えて、そこに平衡化した一次元目のゲルを静かに、気泡を入れないようにして乗せる。このとき、ゲルを乗せるための適当なアクリル板を作成しておくことと便利である。泳動用緩衝液槽に泳動用緩衝液を加えて、ゲル1枚辺り20mA (定電流) で泳動する。電気泳動用緩衝液は次のように作成する。

電気泳動用緩衝液

トリス	3.0g
グリシン	14.4g
SDS	1.0g

純水に溶かして1000mlとする。

上部緩衝液槽にBPBを少量加えておく。BPBがゲルの下部から5mmのところまで移動したら (約4時間後)、泳動を停止する。分離ゲルを取り出し、クマシーブリリアントブルーR250あるいは銀染法で染色する。上述の二次元電気泳動の結果は図1~2に示されている。図1~2は、コムギChinese Spring (CS) およびそのnullisomic-tetrasomic (NT) 系統を用いたWxタンパク質の二次元電気泳動による解析結果を示すものである。図1に示される通り、(i) コムギChinese-Spring (CS) 系統のタンパクは高分子量と低分子量の二つのサブユニットグループ (SG) に分かれた。

(ii) 高分子量のSGはN7AT7B、N7AT7Dでは検出されなかった。

(iii) N4AT4B、N4AT4Dでは低分子量SGの酸性側のサブユニットが薄くなるか欠失していた。

(iv) N7DT7A、N7DT7Bでは逆に塩基性側のサブユニットが欠失していた。これらの結果より、明らかに高分子量のSGは7A染色体上のWx-A1遺伝子にコードされていることが、また低分子量のSGは4A染色体上のWx-B1遺伝子および7D染色体上のWx-D1遺伝子にコードされており、各々の遺伝子由来のSGの等電点は若干異なるため両者のサブユニットが部分的に重なった形になっていることも明かになった。これらの結果を単純なダイアグラムにして図2に表した。国内品種、系統のWxタンパクをこのダイアグラムに当てはめてみたところ、3遺伝子のうちWx-A1だけが発現していない変異個体 (wx^A)、Wx-A1およびWx-B1の両方が発現していない変異個体 (wx^{A B}) が存在することが確認された (図3)。図3中のA3-B3は、Wx-D1遺伝子のみが発現していない変異個体 (wx^D) における泳動図およびそのダイアグラムを示す。

16

3.03g
0.2g

【0013】例2: 6倍体モチコムギの製造

例1の二次元電気泳動法によって確認された、Wx-A1タンパクとWx-B1タンパクを同時に欠きWx-D1タンパクはある6倍体パン小麦 (例えば関東107号、遺伝子型: aabbDD) と、Wx-D1のみを欠いたコムギ (遺伝子型: AABBd) の両者を一般的な方法に従い、次のようにして交配してF₂ 個体を得る。片方のコムギが開花する2~3日前におしべをピンセットで取り去り (除雄)、パーチメント袋 (硫酸紙) をかぶせる。2~3日後に、袋をはずし、このコムギのめしべに他方のコムギの花粉を毛筆ふででふりかける。他からの花粉の飛来を避けるために再び袋をかぶせる。30~40日後に3性雑種個体 (F₁) (遺伝子型: AaBbDd) を得る。得られる3性雑種個体 (F₁) を一般的な方法に従い他からの花粉の飛来を避けるための開花2~3日前にパーチメント (硫酸紙) 袋をかぶせるようにして自家受粉させてF₂ 種子を得る。得られるF₂ 種子についてWxタンパク質の存在の有無を一粒づつ電気泳動法または後記アミロース測定法で分析する。電気泳動法による分析は前記例1に記載の方法に従って行う。最終的に得られるWxタンパク質が検出されないコムギを選抜し、このF₂ 種子 (粉) についてアミロース含量を測定してそのモチ性 (アミロース0%) を確認する。アミロース含量の測定は、一般的な方法に従い (黒田ら、育種学雑誌、前出) ヨード・ヨードカリ呈色反応を用いて行う。このような方法により、F₂ 種子に対して1/64の割合でWxタンパクおよびアミロースを欠いたモチコムギ (遺伝子型: aabbdd) が得られる。

【0014】例3: 4倍体モチコムギの製造

例1の二次元電気泳動法によって確認された、6倍体パンコムギ (染色体数2n=42) のWx-A1とWx-B1を同時に欠いたコムギ (例えば関東107号) (遺伝子型: aabbDD) と4倍体マカロニココムギ (2n=28) (遺伝子型: AABB) の両者を一般的な方法に従い、次のようにして交配してF₂ の個体を得る。片方のコムギが開花する2~3日前におしべをピンセットで取り去り (除雄)、パーチメント袋 (硫酸紙) をかぶせる。2~3日後に袋をはずし、このコムギのめしべに他方のコムギの花粉を毛筆ふででふりかける。他からの花粉の飛来を避けるために再び袋をかぶせる。30~40日後F₁ 雑種個体 (遺伝子型: AaBbD) を得る。得られるF₁ 雑種個体を一般的な方法に従い他からの花粉の飛来を避けるために開花1~3日前にパーチメント袋をかぶせるようにして自家受粉させてF₂ 種子を得る。得られるF₂ 種子についてWxタンパク質の存在の有無を一粒づつ電気泳動法または後記アミロース測定法で分析する。電気泳動法による分析は前記例1に記載の方法

に従って行う。最終的に得られるWxタンパク質が検出されないコムギを選抜し、このF₂種子(粉)について染色体数(2n=28)およびアミロース含量を測定してそのモチ性(アミロース0%)を確認する。アミロース含量の測定は例2と同様の方法で行い、染色体数の確認は一般的な方法に従い次のようにして行う。発芽した種子の根が2~3cmに伸びた時、先端から1~2cmを切ってこれを水を満たした管ビンへ入れる。管ビンごと氷水(0℃)に24時間つける。根を固定液(酢酸:エチルアルコール=1:3)の比からなる)を入れた管ビンに浸す。3~7日後に根を取り出し、酢酸カーミン(カーミンを1%になるように45%酢酸に煮沸して溶かししたもの)に30分~1時間ひたす。この管ビンごとあぶり、つづいて根をとり出し、先端1~2mmをスライドガラスの上へ切り取り、45%酢酸を一滴たらす。カバーガラスをかけ、上からつまようじなどで軽くたたき、根を散らばらせ、カバーガラスの上から指で押しつぶす。これを顕微鏡で観察し染色体を数える。このような方法により、Wxタンパクおよびアミロースを欠く染色体数の減少した4倍体モチコムギ(遺伝子型: a a b b d d)が得られる。

【0015】

【発明の効果】本発明により、穀物、特にコムギにお

る3種のWx遺伝子(Wx-A1、Wx-B1、Wx-D1)の発現の有無を確認する二次元電気泳動法を用いた方法が確立された。このWx遺伝子発現の確認方法を利用して、3種のWx遺伝子のうちの特定のWx遺伝子の発現を欠いた適当な組合せによる6倍体コムギ変異体同士の交配によりすべてのWx遺伝子の発現を欠く6倍体個体を、また、特定のWx遺伝子の発現を欠いた6倍体コムギと特定のWx遺伝子を有する4倍体コムギの適当な組合せによる交配によりWx遺伝子の発現を欠く4倍体個体を、すなわちWxタンパク質が産生されないモチコムギを製造することができる。

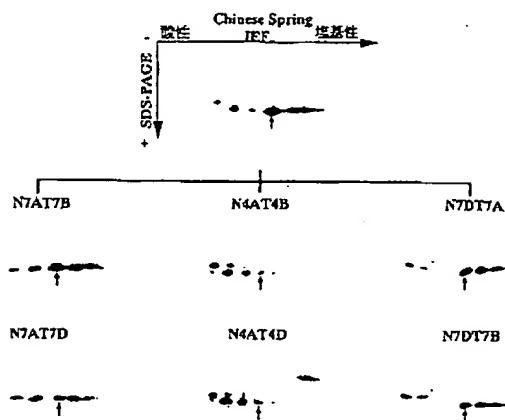
【図面の簡単な説明】

【図1】チャイニーズ・スプリング(Chinese Spring)品種およびそのnullisomic-tetrasomic(NT)系(6種)におけるWxタンパク質の二次元泳動パターンを示す説明図。矢印は同じ位置を示す。

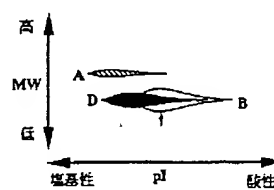
【図2】図1の泳動パターンを単純化したダイアグラムを示す説明図。

【図3】Wx-A1遺伝子の発現を欠く変異個体、Wx-A1およびWx-B1遺伝子の両者の発現を欠く変異個体、およびWx-D1遺伝子の発現を欠く変異個体のそれぞれのWxタンパク質の電気泳動パターンおよびそれを単純化したダイアグラムを示す説明図。

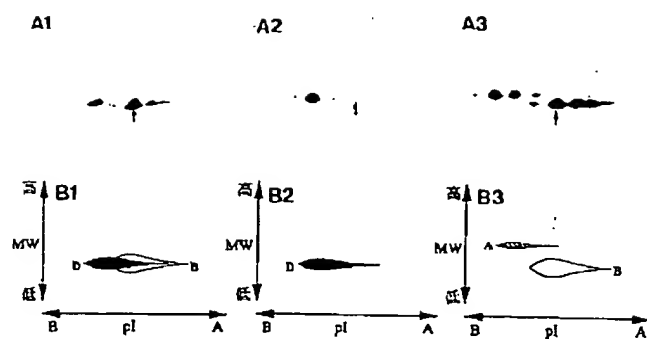
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

G 0 1 N 33/50

// C 0 7 K 3/14

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

P 7055-2J

8517-4H